

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Keiichi YOKOYAMA, et al.

GAU:

SERIAL NO: 09/892,864

EXAMINER: Not yet assigned

FILED: JUNE 28, 2001

FOR: PROCESS FOR PRODUCING TRANSGLUTAMINASE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20230



SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	10-373131	DECEMBER 28, 1998

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith.
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
  - ☐ are submitted herewith
  - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAHER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

Daniel J. Pereira, Ph.D.  
Registration No. 45,518



22850

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

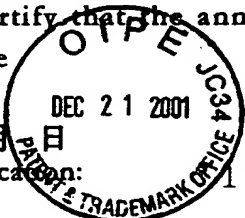
Date of Application: 1998年12月28日

出 願 番 号

Application Number: 平成10年特許願第373131号

出 願 人

Applicant(s): 味の素株式会社



2001年 6月 7日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3053570

【書類名】 特許願

【整理番号】 P6527AJ

【提出日】 平成10年12月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明の名称】 トランスグルタミンナーゼの製造方法

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

【氏名】 横山 敬一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

【氏名】 小野 邦夫

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

【氏名】 江島 大輔

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080229

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 康昌

【電話番号】 045-476-1131

【代理人】

【識別番号】 100080816

【弁理士】

【氏名又は名称】 加藤 朝道

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 030362

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9803677

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスグルタミナーゼの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを少なくとも下記 (a) 及び (b) 工程を含む工程に付することを特徴とする酵素活性を有するトランスグルタミナーゼの製造方法：

(a) 当該変性した状態にある酵素を水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめるようにする工程；及び

(b) 前記構造形成の中間構造を形成した酵素を、水性媒体中 pH 値が中性領域下で酵素活性を有する状態の高次構造を形成せしめるようにする工程。

【請求項 2】

(a) 工程において当該酵素の分子内のシステイン残基のチオール基が遊離形であり、水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめる際に、当該酵素が溶解した状態で酸性下に希釈される請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

(b) 工程において、水性媒体が酵素活性を有する状態の高次構造を形成する促進剤を含有する請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

(b) 工程後に、(c) 当該酵素のうち不活性な酵素を会合凝集物として分離する工程を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

(a) 工程において、当該酵素が当該水性媒体中に溶解しており、(b) 工程において、当該中性領域が、当該 (a) 工程で得られた酵素溶液の pH 値を上昇せしめて中性領域とした領域である請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

当該 (a) 工程において、当該変性した状態にある酵素の酸性溶液を酸性下に希釈するに際して 15℃以下の低温下で希釈され、希釈されたタンパク質濃度が

10 mg/ml 未満である請求項 2 記載の方法。

【請求項 7】

(a) 工程において、水性媒体がタンパク質変性剤を含有する請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを、水性媒体中酸性下に溶解せしめ、その後当該酵素溶液を中性領域に調整して酵素活性を有する状態にある酵素を生成せしめることを特徴とする酵素活性を有するトランスグルタミナーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は新規トランスグルタミナーゼの製造方法、詳しくは変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを、酵素活性を有する状態にリフォールディングして、天然状態にあるものと実質的に同等の活性を有するトランスグルタミナーゼを製造する方法に関する。この方法により、変性した微生物トランスグルタミナーゼを、酵素活性を有する天然状態のものにリフォールディングすることができ、遺伝子組み換え技術を用いて生産した不活性な酵素タンパク質を、大量にかつ安価に高活性な酵素へ変換し、食品加工の分野で広く利用することが可能となる。

【0002】

【従来の技術】

トランスグルタミナーゼは、ゼリー等のゲル化食品、ヨーグルト、チーズ、或いはゲル状化粧品等の製造や食肉の改質等、更にはこれらの分野以外でも広く利用されており、工業的に極めて有用な酵素である。

【0003】

トランスグルタミナーゼ (EC 2.3.2.13; TGase) はタンパク質、又はポリペプチド鎖のグルタミン残基の  $\gamma$ -カルボキシアミド基と一級アミン間でのアシル転移反応を触媒する酵素であり、そのうち微生物 (*Streptoverticillium mobaraense* の variant) の培養上清から見出されたトランスグルタミナーゼを微生物由来

トランスグルタミナーゼ (MTG) と称する。

【0004】

MTGは331個のアミノ酸からなる分子量38000の単量体タンパク質である (Journal of Biological Chemistry, 268, 11565-11572, 1993)。本酵素の大量生産を目的として、上記微生物の培養条件の至適化が図られたが (Agricultural Biological Chemistry, 53, 2613-, 1989)、この微生物は従来タンパク質の工業的生産に広く用いられてきたものではなく、生産量や生産コストの面で課題が多かった。また、本酵素は菌体外に活性な状態で分泌されるが、分子内に脱アミド反応による化学的修飾を容易に受ける配列を4カ所有するため、分泌生産が継続している間に培養液中で化学的修飾が進行し、回収された培養上清には活性が低下した酵素が混合物として蓄積された。これらの問題を解決するために、大腸菌等の微生物を用いた遺伝子組み換えMTG生産法が種々検討された (バイオサイエンスとバイオインダストリー, 52, 554-561, 1994)。

【0005】

本酵素の配列そのものを大腸菌の菌体内で発現させると、その発現量は微量であったが、高発現の可能なT7 gene 10由来配列の断片と融合させることにより、融合タンパク質の高発現に成功した。しかし、この融合タンパク質を限定分解して得られた本来の配列を有する酵素は、天然状態のトランスグルタミナーゼの約1/5の酵素活性しか示さず、この方法で得られた酵素の高次構造の不完全性が示唆された (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 830-835, 1997)。また、融合タンパク質から本酵素の配列のみを切り出すには、消化酵素、或いは化学的手段による限定分解が必要であり、製造法の複雑さに加えて、生産コスト高も大きな問題となった。

【0006】

以上の問題を解決するには、本酵素の配列のみを微生物で直接に高発現する技術を得ること、回収された変性状態の本酵素の高次構造を完全に再形成し、酵素活性を回復する技術 (リフォールディング技術) を得ること、が必要であった。先に本出願人は、MTGを大腸菌の菌体内に発現させる際、使用コドンをも宿主大腸菌用に変更し、プラスミドのコピー数を大幅に増加させることにより、それま



で不可能であった本酵素配列の菌体内高発現に成功し、この内容を発明として特許を出願している（特願平 10-181951 号、平成 10 年 6 月 29 日出願、以下「先の発明」という。）。

このような状況下に、優れたリフォールディング方法の開発が求められている。

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

ところで、タンパク質のリフォールディング技術については、対象とするタンパク質の天然状態を検討してその適正な条件を予測することは不可能であり、実際に対象タンパク質を用いて個々の操作条件を実験的に探索する必要がある（Advances in Protein Chemistry, 50, 1-59, 1997）。先の発明（前記本出願人による特許出願）により、変性した状態にある本酵素を大量に入手可能となり、ここに初めて本酵素リフォールディング技術の検討が可能となった。

#### 【0008】

本発明の目的は、本酵素の安価な工業的製造法を構築するために、遺伝子組み換え微生物により生産されるような変性した状態で得られた本酵素のリフォールディング方法を開発し、天然状態のトランスグルタミナーゼと実質的に同等の酵素活性（即ちトランスグルタミナーゼ活性）を有するトランスグルタミナーゼを製造する方法を提供することにある。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記課題を解決し本発明の目的を達成するために鋭意検討を重ねた結果、変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを少なくとも下記（a）及び（b）工程を含む工程に付することにより酵素活性を有するトランスグルタミナーゼを効率よく製造できることを見出し本発明を完成するに至った：

（a）当該変性した状態にある酵素を水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめるようにする工程；及び

（b）前記構造形成の中間構造を形成した酵素を、水性媒体中 pH 値が中性領域下で酵素活性を有する状態の高次構造を形成せしめるようにする工程。

【0010】

即ち、本発明は前記（a）及び（b）工程を少なくとも含有する、特にリフォーリング工程中に含む、トランスグルタミナーゼの製造方法にある。

【0011】

尚、（a）工程で得られる中間構造を有する酵素は、（a）工程のような処理工程により得られるような、トランスグルタミナーゼ酵素活性を有するが天然に存在するものと比較して実質的に低いものであり、例えば酵素活性が20 U/mg未満の酵素である。

【0012】

更に、本発明には下記の内容が含まれる。

1. 前記（a）工程において、当該酵素の分子内のシステイン残基のチオール基が遊離形であり、水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめる際に、当該酵素が溶解した状態で酸性下に希釈される上記方法。

【0013】

システイン残基部分で2分子が結合するようなダイマーの場合、還元してチオール基を遊離形（フリー）にする方が好ましい。

【0014】

2. 前記（b）工程において、水性媒体が酵素活性を有する状態の高次構造を形成する促進剤を含有する上記方法。

【0015】

（b）工程においては、中性領域に調整する段階を含むが、この際目的とする高次構造を形成促進する促進剤を使用し、特に好ましくはpH値を上昇せしめる前に添加して使用するとよい。その場合の促進剤としては、低分子量化合物が好ましく、例えば塩化カルシウム、塩化ストロンチウム等の無機塩、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム等の有機酸塩、アミノ酸塩、ポリエチレングリコール等のポリオール、DMSO、DMF等の有機溶媒が適宜採用される。

【0016】

3. 前記（b）工程後に、（c）当該酵素のうち不活性な酵素を会合凝集物

として分離する工程を含む上記方法。

【0017】

4. 前記(a)工程において、当該酵素が当該水性媒体中に溶解しており、(b)工程において、当該中性領域が当該(a)工程で得られた酵素溶液のpH値を上昇せしめて中性領域とした領域である上記方法。

【0018】

5. 前記(a)工程において、当該変性した状態にある酵素の酸性溶液を酸性下に希釈する際に、低温下、好ましくは15℃以下で希釈され、希釈されたタンパク質濃度が10mg/ml未満である上記方法。

【0019】

希釈倍率としては5倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは50~400倍程度であり、複数段階に分けて希釈してもよい。また、希釈に際して下記変性剤を使用する場合、希釈前と希釈後とを変性剤の濃度で示すと尿素の場合は4~10M程度の濃度のものを希釈して0.01~0.5M程度の濃度にするのが好ましい。

【0020】

(a)工程は低温下に行うのが好ましく、特に希釈に際して低温下を実施されるのが好ましい。例えば、15℃以下、好ましくは3~10℃程度の低温下で実施することができる。

【0021】

6. 前記(a)工程において、水性媒体がタンパク質変性剤を含有する上記方法。

出発物質のトランスグルタミナーゼは水性媒体中良く溶解している方が好ましく、その溶解補助剤としてタンパク質変性剤を使用することができる。その場合のタンパク質変性剤として、尿素、塩酸グアニジン、チオシアン酸塩等を挙げることができる。使用する濃度としては通常タンパク質を変性するのに使用する濃度や、変性剤の種類等にもよるが、例えば尿素を変性剤として使用する場合4~10M程度で使用するすることができる。希釈する場合は、一度に希釈しても段階的に希釈してもよい。

【0022】

7. 変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを、水性媒体中酸性下に溶解せしめ、その後当該酵素溶液を中性領域に調整して目的とする前記酵素活性を有する状態にある酵素を生成せしめることによりトランスグルタミナーゼを製造する方法。この場合、好ましい処理条件等については上記の記載を利用して行うことができる。

【0023】

次に、本発明の好適な例を示す。

下記工程イ、及びロ、の工程を含む、変性した状態にあるトランスグルタミナーゼ (MTG) から酵素活性を有する天然状態のトランスグルタミナーゼのリフォールディング方法による製造：

(イ) 活性残基のシステイン残基 (Cys) のチオール基が遊離形 (フリー) である、変性、可溶化された微生物由来トランスグルタミナーゼ含有液の pH 値を酸性領域に調整し、好ましくは希薄な変性剤を含む酸性緩衝液に一挙に、好ましくは 50～400 倍程度に希釈し、天然状態と同等の構造形成の中間状態を有する本酵素を得る工程；及び

(ロ) 前記構造形成の中間状態を有する本酵素含有液に直接、或いは構造形成を促進する低分子量化合物を添加した後、アルカリ液を添加して pH 値を中性領域、6～7 程度にまで上昇せしめ、本酵素の高次構造形成を促進、或いは当該高次構造を形成させるとともに、必要により構造形成に到らない不活性な画分を会合凝集物として分離する工程。

【0024】

【発明の実施の形態】

次に、本発明の実施の形態について詳細に説明する。特に、組み換え大腸菌を培養して得られる変性した状態にある酵素を含む培養物から好適な例として具体的にリフォールディングをする場合を中心に説明するが、本発明はこれに限定されることはない。

【0025】

本発明に使用する出発物質である被処理物は、変性した状態にあるトランスグ

ルタミナーゼ、好ましくは微生物由来の変性トランスグルタミナーゼ (MTG) のように天然状態の高次構造を有さないトランスグルタミナーゼで実質的に酵素活性を示さないもの、更には最終的にトランスグルタミナーゼ活性を発揮し得る配列を有する酵素が本発明の出発物質に含まれる。

## 【0026】

より詳細に説明すると、天然状態のトランスグルタミナーゼ配列はN端のアスパラギン酸残基 (1番目) から始まりC端のプロリン残基 (331番目) に終わる 331個のアミノ酸で構成され、そのようなタンパク質は勿論本発明の出発物質に含まれる。その他2番目から331番目のアミノ酸残基を有する330のアミノ酸 (1番目のプロリン残基が欠失している。) で構成されるタンパク質や、それらに更に、N端側及び／又はC端側にアミノ酸残基が1個又は複数個配列して結合するタンパク質であってトランスグルタミナーゼ活性を実質的に示さないがその高次構造の転移により当該活性を有する可能性のあるものが含まれる。これらの配列を有するタンパク質において、前記したように1個又は複数アミノ酸残基の、1カ所又は複数カ所における欠失又は付加若しくは挿入、並びに／又はアミノ酸1個又は複数により置換されたタンパク質であってトランスグルタミナーゼ活性を有する可能性のある配列を有するタンパク質は本発明の出発物質に含まれる。

## 【0027】

本発明で用いる出発物質の代表的な例としては、微生物由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子を組み込んだ微生物、例えば組み換え大腸菌を培養して得られる変性酵素を含む培養物を挙げることができる (先の発明：前記本出願人による特許先願、後述の実施例中の製造例参照)。ここで、微生物由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子の一部が変化し、発現されるアミノ酸配列の一部が、その1カ所又は複数カ所において欠損及び／又は置換 (1個又は複数個のアミノ酸残基で) されたり、並びに／又は1個又は複数のアミノ酸で付加、挿入されたりしても、最終的にトランスグルタミナーゼ活性を発揮し得る配列であれば、本発明に使用する出発物質として使用できる。

## 【0028】

大腸菌を生産宿主として用いた場合、微生物由来トランスグルタミナーゼの殆どは菌体中に不溶性顆粒として蓄積されるので、この顆粒を出発物質とすることができる。その場合、常法に従って回収された微生物由来トランスグルタミナーゼの不溶性顆粒を水性媒体中好ましくは可溶化せしめる。その際、1 mMのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 水溶液に懸濁後、尿素、塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤を用いて可溶化するとよい。その他可溶化するための変性剤としては、チオシアン酸塩等を挙げることができる。

## 【0029】

尿素濃度と塩酸グアニジン濃度は、一般にタンパク質を変性するに必要なそれぞれ7 ~ 10 M、4 ~ 7 M程度でよい。微生物由来トランスグルタミナーゼの濃度には特に制限がないが、できるだけ高濃度、例えば10 ~ 100 mg/ml程度にするのが以降の操作上好ましい。

## 【0030】

このような水溶液に、例えばダイマーに見られるようなジスルフィド結合について還元をする場合には還元剤を添加するのが好ましい。その場合、その水溶液に直ちに、還元剤、例えばジチオスレイトール (DTT) を20 mMになるよう添加し、pH値を7.5に調整後、37 °Cで約2時間攪拌して可溶化するとよい。

## 【0031】

次いで、このようにして得られた微生物由来トランスグルタミナーゼの可溶化液に塩酸等の酸を適量添加してpH値を、2 ~ 7、より好ましくは3 ~ 5、更に好ましくは3.5 ~ 4.5程度に調整し、同じ濃度の変性剤と還元剤を含む同じ又は同程度のpH値の緩衝液を用いて希釈し、濃度を、10 ~ 100 mg/ml、より好ましくは20 ~ 80 mg/ml程度に調整する。このような酸性下での希釈操作が前記高次構造の形成を促進する上で好ましい。処理温度は低温である方が好ましく、0 ~ 15 °C、好ましくは3 ~ 10 °C程度で処理するとよい。

## 【0032】

上記に得られた溶液を予め3 ~ 10 °Cに冷却しておいた5 ~ 50 mM、好ましくは15 ~ 25 mMの酢酸ナトリウム、pH 3 ~ 5、好ましくは3.5 ~ 4.5の緩衝液中に希釈して、タンパク質濃度を0.2 ~ 4 mg/ml、尿素濃度を0.01 ~ 0.5 Mに調整

することにより、変性酵素を構造形成の中間状態へと導くことができる。変性酵素の希釈は他段階に分けて行うこともできるが、全体での希釈倍率としては、好ましくは50～400倍程度であり、変性剤を使用する場合、変性剤の濃度で示すと尿素の場合4～10M程度のものを希釈して0.01～0.5M程度にするとよい。

## 【0033】

中間状態の形成は、例えばVydac 214TP54 (4.6  $\phi$  x 250 mm、SEPARATIONS GROUP) を用いる逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と、例えばSuperdex-75 HR 10/30 (10  $\phi$  x 300 mm、アマシャム・ファルマシア・バイオテク) を用いる高速ゲルろ過クロマトグラフィーのそれぞれで検出される、微生物由来トランスグルタミナーゼのピークエリアを比較検討することにより確認することができる。ここで、文献 (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 830-835, 1997) に記載の方法で測定された中間状態の酵素活性は低く、例えば比活性として10～20 U/mg程度であり、天然状態の酵素活性 (約30 U/mg) を大きく下まわる。このような酵素活性を含むもの又はその画分を本発明における (a) 工程で得られる「構造形成の中間構造」を有する酵素に含まれる。従って、このような低い酵素活性を有するMTGが生成した段階で (その採取工程を含むことなく) 本発明における (a) 工程が終了する。

## 【0034】

上記の希釈法に代えて、ゲルろ過クロマトグラフィーや透析により中間状態を形成することも可能であるが、希釈法に比較して酵素タンパク質の回収率や酵素活性 (比活性) の低下を招くので、好ましくない。尚、前記低い酵素活性が得られれば、特に本発明においては (a) 工程における酵素を分離する必要はなく (b) 工程に付すことができる。

## 【0035】

続いて、(b) 工程においては前記の如くして得られたような中間状態を形成した酵素を含む溶液をpH値が中性領域で処理するとよい。この場合そのような酵素の液を低温下、例えば15℃以下、好ましくは3～10℃に維持したまま、pH値を上昇せしめて中性領域にすることができる。中性領域を調製する方法と

して好ましくは、これにアルカリ液を添加し、pH値を5.8 ~ 8.5、好ましくは6 ~ 7に上昇し、生じた沈殿を遠心分離して除去することにより、構造形成を完了した微生物由来トランスグルタミナーゼのみを含む上清を回収できる。従って、この方法によれば上記構造形成を成し得なかった活性を有さない酵素は会合凝集物として容易に分離できるので、極めて有利である。上記目的とする酵素活性を有する構造形成が一部でも得られた段階で（採取工程を含むことなく）本発明における（b）工程は終了する。

## 【0036】

上清の酵素活性は約30 U/mgと天然状態と同等にまで高まり、各種HPLCにおける溶出ピークプロファイル、分光学的性質、及び熱安定性は天然状態の微生物由来トランスグルタミナーゼと完全に、又は実質的に一致する。以上より、変性タンパク質から天然状態の酵素へのリフォールディングが完了したことが分かる。尚、酵素の分離、精製工程はトランスグルタミナーゼその他酵素の分離、精製方法として知られている方法を利用すれば容易に行うことができる。

## 【0037】

また、中間状態のpH値を上昇する際、予めここへ促進剤として低分子量化合物を添加しておくことにより、中間状態から天然状態への構造形成を促進することができる。例えば、0.01 ~ 10 mMの塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ) 等の2価の金属塩は、中間状態に対して構造転移の核となる局所的な構造形成を促進し、天然状態への転移を促進すると考えられる。また、塩化カルシウム以外で塩化ストロンチウム等の無機塩を採用することができる。更に、0.1 ~ 2 Mの酢酸ナトリウムやプロピオン酸ナトリウム等の有機酸塩、0.1 ~ 2 Mのアルギニン塩酸塩等のアミノ酸塩、10 ~ 40 %のジメチルスルホキシド (DMSO) やジメチルホルムアミド (DMF) 等の有機溶媒、1 ~ 10 %のポリエチレングリコール等のポリオールや1 ~ 50 mMのCHAPS等の界面活性剤は、緩衝液の性質を変えることにより天然状態への構造転移の過程で生じる酵素の会合凝集を抑制し、本酵素タンパク質の回収率を向上するものと考えられる。

## 【0038】

このように生成して得られたトランスグルタミナーゼは極めて高純度であり、



これを分離し、単離するには特に困難は無く、酵素（トランスグルタミナーゼ）の単離方法として慣用又は知られている方法を利用して容易に行うことができる。

【0039】

このように本発明において得られるトランスグルタミナーゼは天然状態にあるものと実質的に同等の活性を有し、かつ極めて高純度であるため、更に精製する必要がなく、そのまま食品等各種の分野で、天然状態のトランスグルタミナーゼと同様に使用することができる。

【0040】

【実施例】

以下、製造例及び実施例により本発明を具体的に説明する。

【0041】

（出発物質の製造例）

微生物由来トランスグルタミナーゼをコードするDNAを導入した大腸菌を2 x Y T培地で培養し、微生物由来トランスグルタミナーゼを不溶性顆粒として菌体内に蓄積させたものを出発物質として使用すべく下記のように調製した。尚、この詳細な内容については前記先の発明について本出願人による特願平10-181951号、平成10年6月29日出願の明細書に詳細に説明されている。

【0042】

MTGは、菌体内に不溶性顆粒として蓄積するので、下記のように菌体破碎液の遠心沈殿画分に含まれ、以後の実施例では、この遠心沈殿画分を顆粒として用いた。尚、この顆粒はトランスグルタミナーゼ活性は示さなかった。

【0043】

E.coliにおけるMTGの大量発現

〈1〉MTG発現プラスミドpTRPMTG-01の構築

MTG遺伝子は、E.coliや酵母のコドン使用頻度を考慮して、既に、全合成されている（特開平5-199883号公報参照）。しかしながら、この遺伝子配列は、E.coliでの発現に最適なものになっていなかった。即ち、30個存在するアルギニン残基のコドンが全てマイナーコドンであるAGAであった。そこで、まず、MT

G遺伝子のN末端から約200塩基をE.coliの発現に最適なように再合成することとした。

【0044】

MTG遺伝子を転写するプロモーターは、培地中のトリプトファンの欠乏で容易に転写が誘導されるtrpプロモーターを用いることとした。マダイ・トランスグルタミナーゼ(TG)遺伝子を高発現したプラスミドpTTG2-22(特開平6-225775号公報参照)は、trpプロモーターを用いており、マダイTG遺伝子上流の配列は、E.coliにおいて異種タンパク質が高発現するようにデザインされている。

【0045】

pTRPMTG-01の構築には、図1に示したようにマダイTG発現プラスミドpTTG2-22(特開平6-225775号公報参照)のtrpプロモーター下流にあるClaI部位から下流のBglII部位までを合成DNA遺伝子ClaI/HpaI断片とpGEM15BTG(特開平6-30771号公報参照)のHpaI/BamHI断片(小)に置き換えることによって構築した。

【0046】

合成DNA遺伝子ClaI/HpaI断片は、pTTG2-22のtrpプロモーター下流のClaI部位から翻訳開始コドンまでの配列とMTG遺伝子のN末端から216塩基を持つ遺伝子配列である。MTG構造遺伝子部分に関しては、E.coliの発現に最適なようにE.coliのコドン使用頻度を参考にして塩基配列を決定した。但し、mRNAの高次構造形成を除去するためN末端部分をコードする領域中の縮重コドンの3文字目をアデニン、ウラシルに富むコドンへ変換し、できるだけ同じ塩基が続かないよう配慮した。

【0047】

合成DNA遺伝子ClaI/HpaI断片は、末端にEcoRI、HindIIIを持つようにデザインした。デザインした遺伝子を+鎖と-鎖がお互いにオーバーラップするように約40~50塩基に分割し、各々の配列に相当するDNAを12本合成した(配列表配列番号2から13)。この合成DNAの5'末端をリン酸化し、ペアになる合成DNAをアニーリング後、連結した。その後、アクリルアミドゲル電気泳動を行い、目的の大きさのDNAを切り出し、pUC19のEcoRI/HindIII部位に組み込

んだ。塩基配列を確認し、正しいものをpUCN216 と名付けた。このpUCN216 から、ClaI/HpaI 断片（小）を切り出し、pTRPMTG-01の構築に用いた。

【0048】

<2> MTG発現プラスミドpTRPMTG-02の構築

pTRPMTG-01を保持するE.coli JM109は、MTGを高発現しなかったため、MTG遺伝子のN末端の改変した部分以外の部分（777塩基）も、E.coli用に改変することとした。777塩基を一度に合成するのは難しいので、E.coliのコドン使用頻度を参考にして塩基配列を決定した後、約200塩基ずつ4つのブロック（B1, 2, 3, 4）に分けて合成することとした。各ブロックは、末端にEcoRI、HindIIIを持つようにデザインした。デザインした遺伝子を+鎖と-鎖が互いにオーバーラップするように約40～50塩基に分割し、各々の配列に相当するDNAを各ブロック10本ずつ計40本合成した（配列表配列番号14から53）。この合成DNAの5'末端をリン酸化し、ペアになる合成DNAをアニーリング後、連結した。その後、アクリルアミドゲル電気泳動を行い、目的の大きさのDNAを切り出し、pUC19のEcoRI/HindIII部位に組み込んだ。塩基配列を確認し、正しいものをそれぞれpUCB1, B2, B3, B4と名付けた。次に、図2に示すように、B1とB2、B3とB4を連結したpUCB1-2、pUCB3-4を作製し、更にpTRPMTG-01、pUCN216、pUCB1-2、pUCB3-4より、pTRPMTG-02を構築した。pTRPMTG-02上に存在する高発現MTG遺伝子を含む塩基配列を配列表配列番号1に示す。

【0049】

<3> MTG発現プラスミドpUCTRPMTG-02（+）、（-）の構築

このpTRPMTG-02を保持するE.coli JM109も、MTGを高発現しなかったため、プラスミドを多コピー化することとした。pTRPMTG-02のtrpプロモーターを含むEco0109I断片（小）を平滑化後、多コピープラスミドであるpUC19のHincII部位に組み込み、lacZのプロモーターとtrpプロモーターが同一のもの（pUCTRPMTG-02（+））と逆向きのもの（pUCTRPMTG-02（-））を構築した。

【0050】

<4> MTGの発現

pUCTRPMTG-02（+）、pUC19で形質転換したE.coli JM109を、150 µg/mlのア

ンピシリンを含む3mlの2 x Y T培地で、37℃、10時間振盪培養した（前培養）。この前培養液0.5ml を150  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む50mlの2 x Y T培地に添加し、37℃、20時間振盪培養した。

## 【0051】

培養液から、菌体を集菌し、超音波破碎した。この菌体破碎液の全画分、遠心上清画分、遠心沈殿画分をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて展開した結果を図3に示す。pUCTRPMTG-02 (+)/JM109 の菌体破碎全画分、遠心沈殿画分にMTGと同一分子量を有するタンパク質の高発現が確認された。また、ウエスタンブロッティングによって、このタンパク質がマウス抗MTG抗体と反応することが確認された。このタンパク質の発現量は500 ~600mg/L であった。なお、生産培地には、3- $\beta$ -インドールアクリル酸を加えなくとも、十分な高発現が見られた。

## 【0052】

更に、マウス抗MTG抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、遠心上清画分にはMTGがわずかししか発現しておらず、発現したMTGは殆ど全て不溶性タンパク質封入体となっていることが分かった。

## 【0053】

## 〈5〉 発現MTGのN末端アミノ酸の解析

発現したMTGのタンパク質封入体についてN末端アミノ酸残基の解析を行ったところ、N末端の配列は約60%がメチオニン残基で約40%がフォルミルメチオニン残基であった。開始コドンに相当する（ホルミル）メチオニン残基を除去するため、以下のような工夫を行った。

## 【0054】

## 〈6〉 MTGのN末端アスパラギン酸残基の欠失

MTGのN末端に相当する216塩基を含むpUCN216を鋳型として、PCRを行うことによって、アスパラギン酸残基に相当する塩基配列を欠失させた。pUCN216は、MTGのN末のClaI-HpaI断片を含む約216bpがpUC19のEcoRI/HindIII部位にクローニングされたプラスミドである。pF01（配列表配列番号54）、pR01（配列表配列番号55）はベクター中の配列を持つプライマーであり、pDELD（

配列表配列番号 56) は Asp 残基に相当する塩基配列を欠失させたもの、pHd01 (配列表配列番号 57) は C を G に変えて HindIII 部位を潰したものである。pF01、pDELD はセンスプライマー、pR01、pHd01 はアンチセンスプライマーである。

#### 【0055】

まず、pF01とpHd01、pDELD とpR01の組み合わせでpUCN216 に対して、それぞれPCR を94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分の条件で35サイクル行った。各PCR産物をフェノール/クロロホルムで抽出した後、エタノール沈殿を行い、100 μL のH<sub>2</sub>O に溶解した。

#### 【0056】

各PCR産物から1 μL ずつ取って混ぜ94℃で10分間熱変性した後、pF01とpHd01のプライマーの組み合わせで、PCR を94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分の条件で35サイクル行った。

#### 【0057】

2 回目のPCR産物をフェノール/クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿したものを、HindIII、EcoRI 処理をし、pUC19 サブクローニングしpUCN216Dを得た(図4)。得られたpUCN216Dのシーケンスを確認したところ目的通りのものであった。

#### 【0058】

##### <7> アスパラギン酸残基欠失プラスミドの構築

pUCN216DのEco0109I/HpaI 断片(小)を、pUCB1-2 (MTG 遺伝子のHpaI/BglIII断片がpUC19 のEcoRI/HindIII 部位にクローニングされたプラスミド)のEco0109I/HpaI 断片(大)と結合し、pUCNB1-2D とした。更に、pUCNB1-2D のClaI/BglII断片(小)を、MTG高発現プラスミドであるpUCTRPMTG-02(+)のClaI/BglIII断片(大)と結合し、アスパラギン酸残基除去MTG発現プラスミドpUCTRPMTG(+)D2とした(図5)。その結果、図6に示すように、アスパラギン酸残基に相当するGAT が欠失したMTG遺伝子を含むプラスミドを得た。

#### 【0059】

##### <8> アスパラギン酸残基欠失MTGの発現

pUCTRPMTG(+ )D2 で形質転換したE.coli JM109を、150  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む3mlの2 x Y T培地で、37℃、10時間振盪培養した（前培養）。この前培養液0.5ml を150  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む50mlの2 x Y T培地に添加し、37℃、20時間振盪培養した。菌体を超音波破碎した後の破碎上清及び沈殿の、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のクマシー・ブリリアント・ブルー染色やマウス抗MTG抗体を用いたウェスタン・ブロッティングの結果から、超音波破碎後沈殿即ち不溶画分にアスパラギン酸残基欠失MTGタンパク質が検出された。これは、アスパラギン酸残基欠失MTGタンパク質がタンパク質封入体として菌体内に蓄積したことを示している。

【0060】

また、このタンパク質封入体についてN末端アミノ酸配列の解析を行ったところ、図7に示すように、N末端の配列の約90%がセリンであった。

【0061】

<5>と<8>で得られた発現MTGのN末端アミノ酸についての結果を比較すると、表1のようになり、MTGのN末端アスパラギン酸残基を欠失させることにより、発現MTGのN末端に付加される開始メチオニンが効率的に除去されることが分かった。

【0062】

【表1】

表1

菌 株 名	末端アミノ酸			
	f-Met	Met	Asp	Ser
pUCTRPMTG-02(+ )/JM109	40 %	60 %	N.D.	—
pUCTRPMTG(+ )D2/JM109	N.D.	10 %	—	90 %

N.D. : 検出できず。

【0063】

（実施例1）

前記出発物質の製造例のようにして調製された顆粒（前記遠心沈殿画分）を用

いて顆粒懸濁液(1 mM EDTA)を調製、尿素を最終的に8 Mになるよう添加、更に20 mM DTTを添加した後、20 mM リン酸緩衝液でpH 7.5に調整し、37 °Cで2時間攪拌抽出して変性酵素液とした。変性酵素の含有量を前述の逆相HPLCで測定した後、以降の実験に用いるまで、小分けして-80 °Cに凍結保存した。

## 【0064】

変性酵素液(酵素の濃度:約50 mg/ml)に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mMジチオスレイトール(DTT)を含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液(2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0)、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。この時の反応条件は、変性酵素濃度、0.2 mg/ml;尿素濃度、0.04 Mとなった。文献(Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 830-835, 1997)に記載の方法で求めた反応溶液中の酵素活性(比活性)は19.4 U/mgであった。5 °Cで攪拌を30分間継続し、続けて4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性はpH値上昇前の1.5 倍に上昇して29.0 U/mgに達し、天然状態の微生物由来トランスグルタミナーゼとほぼ一致した。変性酵素からのタンパク質回収率は53.6 %であった。

## 【0065】

以上のリフォールディング反応条件を維持したまま、実験スケールのみを10倍に向上し、500 mlの緩衝液を用いて希釈、pH 6.0に上昇後、遠心分離して上清を得た。この酵素の比活性は33.7 U/mg、変性酵素液からのタンパク質回収率は41.9 %であった。この酵素液を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、得られた精製酵素の性状を(1)逆相HPLC(図8参照)、(2)CDスペクトル(図9参照)、(3)示差走査熱量計(DSC)を用いて、天然状態の微生物由来トランスグルタミナーゼと比較したところ、両者に実質的な差異は認められなかった。

## 【0066】

## (実施例2)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し

、変性酵素濃度を0.2 mg/mlに調整した。この変性酵素液の6 mlを、20 mM DTTを含有する20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0緩衝液に平衡化されたセファデックスG-25Mカラム (1.6  $\phi$  x 15 cm、アマシャム・ファルマシア・バイオテク) に負荷し、同じ緩衝液で展開した。波長280 nmでのUV吸収を指標にタンパク質画分を回収した。クロマトグラフィーは室温で実施した。回収画分を5℃に30分間以上冷却し、そのまま4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。この酵素の比活性は23.4 U/mg、変性酵素液からのタンパク質回収率は39.8 %となり、実施例1で得られた酵素の比活性、タンパク質回収率の何れよりも低下した。

【0067】

(実施例3)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を0.2 mg/mlに調整した。この変性酵素液の1 mlを透析膜 (Spectra/Por membrane, No1; Spectrum Medical Industries, Inc.) に注入し、1000 mlの緩衝液 (2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0) に対して、5℃で終夜透析した。得られた透析内液に4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。この酵素の比活性は31.1 U/mg、変性酵素液からのタンパク質回収率は42.6 %となり、実施例1で得られたタンパク質回収率よりも低下した。

【0068】

(実施例4)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 6.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5℃に冷却しておいた希釈用緩衝液 (2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0)、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。この時の反応条件は、変性酵素濃度、0.2 mg/ml; 尿素濃度、0.04 Mとなった。5℃で攪拌を30分間継続し、遠心分離して上清を得た。上清にはタンパク質は全く検出されず、リフォールディングに供し



た変性酵素は全て会合凝集した。

【0069】

更に、実施例1と同様に調製された変性酵素液に4 M 水酸化ナトリウムを滴下し、pH 9.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 9.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液（2 mM DTTを含む20 mM トリス塩酸塩、pH 9.0）、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。この時のタンパク質回収率は18.9 %であったが、酵素活性は全く検出されなかった。続けて濃塩酸を滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。上清にはタンパク質は全く検出されず、リフォールディングに供した変性酵素は全て会合凝集した。

【0070】

以上の結果は実施例1の有効性と共に、希釈操作を行う際のpH値は酸性に保たなければならないことを示している。

【0071】

（実施例5）

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液（2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0）、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5 °Cで攪拌を30分間継続し、再びpH 4.0の変性酵素液（40 mg/ml）を0.25 ml、希釈注入した。この操作を更に2回繰り返し、合計4回に分割して希釈を行った結果、最終的な反応条件は、変性酵素濃度、0.78 mg/ml；尿素濃度、0.16 Mとなった。5 °Cで攪拌を30 分間継続し、続けて4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性は32.8 U/mg、変性酵素液からタンパク質回収率は59.0 %となった。希釈操作を分割することなく、1 mlの変性酵素液（pH 4.0、40 mg/ml）を一挙に希釈注入した場合、得られた上清の比活性は同等であったが（32.8 U/mg）、タンパク質回収率は4分割して希釈した場合より3 %低下して56 %となった。

## 【0072】

## (実施例6)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液(2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0)、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5 °Cで攪拌を30 分間継続し、 $\text{CaCl}_2$ を1 mMになるように添加し、再び5 °Cで30 分間攪拌した。この時の反応条件は、変性酵素濃度、0.2 mg/ml; 尿素濃度、0.04 M;  $\text{CaCl}_2$ 濃度、1 mMとなった。続けて4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性は30.0 U/mg、変性酵素液からタンパク質回収率は60.1 %となった。対照として $\text{CaCl}_2$ を添加しないリフォールディングを同時に行ったところ、得られた酵素の比活性は31.7 U/mgと同等なものの、変性酵素液からタンパク質回収率は51.3 %と約9 %の差異を示し、pH値を6.0へ上昇する前に $\text{CaCl}_2$ を添加する効果を確認できた。一方、希釈用緩衝液に予め $\text{CaCl}_2$ を1 mM添加しておくと、比活性は25.3 U/mg、タンパク質回収率は53.2 %と、pH値上昇前に加えた場合より何れも低下した。

## 【0073】

## (実施例7)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液(2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0)、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5 °Cで攪拌を30分間継続し、 $\text{StCl}_2$ を0.1 mMになるように添加し、再び5 °Cで30 分間攪拌した。この時の反応条件は、変性酵素濃度、0.2 mg/ml; 尿素濃度、0.04 M;  $\text{StCl}_2$ 濃度、0.1 mMとなった。続けて4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性は27.3 U/mg、変性酵素液からタンパク質回収率は84.5 %となり、実施例1のタンパク質回収率(53.6 %)と比較して大幅に向上した。

## 【0074】

## (実施例 8)

実施例 1 と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを 8 M 尿素と 20 mM DTTを含む 20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を 40 mg/mlに調整した。この 0.25 mlを、予め 5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液 (2 mM DTTを含む 20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0)、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5 °Cで攪拌を 30分間継続し、界面活性剤である CHAPS (3-[(3-Cholamidoisopropyl)dimethyl-ammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate) を 10 mMになるように添加し、再び 5 °Cで 30 分間攪拌した。この時の反応条件は、変性酵素濃度、0.2 mg/ml; 尿素濃度、0.04 M; CHAPS 濃度 10 mMとなった。続けて、4 M 水酸化ナトリウムを滴下して pH 値を 6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性は 29.3U/mg、変性酵素液からタンパク質回収率は 93.0%となり、実施例 1 のタンパク質回収率 (53.6%) と比較して大幅に向上した。

## 【0075】

## 【発明の効果】

本発明で使用される前記リフォールディング法によれば遺伝子組み換え微生物により生産されるような変性した状態で得られた本酵素を、天然状態のトランスグルタミナーゼと実質的に同等の酵素活性、即ちトランスグルタミナーゼ活性を有するトランスグルタミナーゼを工業的に、しかも極めて高純度に製造することができ、故に更に精製する必要もなくそのまま食品等各種の分野で広く天然状態のトランスグルタミナーゼと同様に使用することが可能である。

特に、酸性溶液中における希釈、好ましくは pH 値をほぼ一定にした状態での希釈処理及びその後の中性領域への調整により、変性した状態にあるトランスグルタミナーゼからその目的とする高次構造形成を効率よく促進し目的とする酵素活性を有する酵素を製造することができる。

## 【0076】

## 【配列表】

【 0 0 7 7 】

配列番号 : 1

配列の長さ : 1518

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 87..1082

特徴を決定した方法 : S

配列

TTCCCCTGTT GACAATTAAT CATCGAACTA GTTAACTAGT ACGCAAGTTC ACGTAAAAAG

60

GGTATCGATT AGTAAGGAGG TTAAAA ATG GAT TCT GAC GAT CGT GTT ACT CCA

113

Met Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro

1

5

CCA GCT GAA CCA CTG GAT CGT ATG CCA GAT CCA TAT CGT CCA TCT TAT

161

Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr

10

15

20

25

GGT CGT GCT GAA ACT GTT GTT AAT AAT TAT ATT CGT AAA TGG CAA CAA

209

Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln

30

35

40

GTT TAT TCT CAT CGT GAT GGT CGT AAA CAA CAA ATG ACT GAA GAA CAA

257

Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln

45	50	55
CGT GAA TGG CTG TCT TAT GGT TGC GTT GGT GTT ACT TGG GTT AAC TCT		
305		
Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser		
60	65	70
GGT CAG TAT CCG ACT AAC CGT CTG GCA TTC GCT TCC TTC GAT GAA GAT		
353		
Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp		
75	80	85
CGT TTC AAG AAC GAA CTG AAG AAC GGT CGT CCG CGT TCT GGT GAA ACT		
401		
Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr		
90	95	100
105		
CGT GCT GAA TTC GAA GGT CGT GTT GCT AAG GAA TCC TTC GAT GAA GAG		
449		
Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu		
110	115	120
AAA GGC TTC CAG CGT GCT CGT GAA GTT GCT TCT GTT ATG AAC CGT GCT		
497		
Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala		
125	130	135
CTA GAG AAC GCT CAT GAT GAA TCT GCT TAC CTG GAT AAC CTG AAG AAG		
545		
Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys		
140	145	150
GAA CTG GCT AAC GGT AAC GAT GCT CTG CGT AAC GAA GAT GCT CGT TCT		
593		
Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser		
155	160	165

CCG TTC TAC TCT GCT CTG CGT AAC ACT CCG TCC TTC AAA GAA CGT AAC  
641

Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn  
170 175 180 185

GGT GGT AAC CAT GAT CCG TCT CGT ATG AAA GCT GTT ATC TAC TCT AAA  
689

Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys  
190 195 200

CAT TTC TGG TCT GGT CAG GAT AGA TCT TCT TCT GCT GAT AAA CGT AAA  
737

His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys  
205 210 215

TAC GGT GAT CCG GAT GCA TTC CGT CCG GCT CCG GGT ACT GGT CTG GTA  
785

Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val  
220 225 230

GAC ATG TCT CGT GAT CGT AAC ATC CCG CGT TCT CCG ACT TCT CCG GGT  
833

Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly  
235 240 245

GAA GGC TTC GTT AAC TTC GAT TAC GGT TGG TTC GGT GCT CAG ACT GAA  
881

Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu  
250 255 260 265

GCT GAT GCT GAT AAG ACT GTA TGG ACC CAT GGT AAC CAT TAC CAT GCT  
929

Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala  
270 275 280

CCG AAC GGT TCT CTG GGT GCT ATG CAT GTA TAC GAA TCT AAA TTC CGT

977

Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg

285 290 295

AAC TGG TCT GAA GGT TAC TCT GAC TTC GAT CGT GGT GCT TAC GTT ATC

1025

Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile

300 305 310

ACC TTC ATT CCG AAA TCT TGG AAC ACT GCT CCG GAC AAA GTT AAA CAG

1073

Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln

315 320 325

GGT TGG CCG TAATGAAAGC TTGGATCTCT AATTACTGGA CTTACACACAG ACTAAAATAG

1131

Gly Trp Pro

330

ACATATCTTA TATTATGTGA TTTTGTGACA TTTCCTAGAT GTGAGGTGGA GGTGATGTAT

1191

AAGGTAGATG ATGATCCTCT ACGCCGGACG CATCGTGGCC GGCATCACCG GCGCCACAGG

1251

TGCGGTTGCT GGCGCCTATA TCGCCGACAT CACCGATGGG GAAGATCGGG CTCGCCACTT

1311

CGGGCTCATG AGCGCTTGTT TCGGCGTGGG TATGGTGGCA GGCCCCGTGG CCGGGGGACT

1371

GTTGGGCGCC ATCTCCTTGC ATGCACCATT CCTTGCGGCG GCGGTGCTCA ACGGCCTCAA

1431

CCTACTACTG GGCTGCTTCC TAATGCAGGA GTCGCATAAG GGAGAGCGTC GAGAGCCCGC

1491

CTAATGAGCG GGCTTTTTTT TCAGCTG

1518

【0078】

配列番号：2

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATTCATCGA TTAGTAAGGA GGTTTAAAAT GGATTCTGA

39

【0079】

配列番号：3

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGATCGTCAG AATCCATTTT AAACCTCCTT ACTAATCGAT G

41

【0080】

配列番号：4

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列



CGATCGTGT ACTCCACCAG CTGAACCACT GGATCGTATG C

41

【0081】

配列番号：5

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCTGGCAT ACGATCCAGT GGTTCAGCTG GTGGAGTAAC A

41

【0082】

配列番号：6

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAGATCCATA TCGTCCATCT TATGGTCGTG CTGAAACTGT T

41

【0083】

配列番号：7

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATTAACAACA GTTTCAGCAC GACCATAAGA TGGACGATAT G

41

【0084】

配列番号：8

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTTAATAATT ATATTCGTAA ATGGCAACAA GTTTATTCTC A

41

【0085】

配列番号：9

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCACGATGAG AATAAACTTG TTGCCATTTA CGAATATAAT T

41

【0086】

配列番号：10

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCGTGATGGT CGTAAACAAC AAATGACTGA AGAACAACGT G

41

【0087】

配列番号：11

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCCATTCACG TTGTTCTTCA GTCATTGTGTT GTTTACGACC A

41

【0088】

配列番号：12

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATGGCTGTC TTATGGTTGC GTTGGTGTTA CTTGGGTAA CA

42

【0089】

配列番号：13

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCTTGTTAA CCCAAGTAAC ACCAACGCAA CCATAAGACA

40

【0090】

配列番号：14

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATTCGTAA CTCTGGTCAG TATCCGACTA ACCGTCTG

38

【0091】

配列番号：15

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGAATGCCAG ACGGTTAGTC GGATACTGAC CAGAGTTAAC G

41

【0092】

配列番号：16

配列の長さ：49

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCATTCGCTT CCTTCGATGA AGATCGTTTC AAGAACGAAC TGAAGAACG

49

【0093】

配列番号：17

配列の長さ：49

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGACGACCGT TCTTCAGTTC GTTCTTGAAA CGATCTTCAT CGAAGGAAG

49

【0094】

配列番号：18

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCGTCCGCG TTCTGGTGAA ACTCGTGCTG AATTC

35

【0095】

配列番号：19

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACCTTCGAA TTCAGCACGA GTTTCACCAG AACGC

35

【 0 0 9 6 】

配列番号：20

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAAGGTCGTG TTGCTAAGGA ATCCTTCGAT GAAGAGAAAG GCTTCCAG

48

【 0 0 9 7 】

配列番号：21

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAGCAGCTG GAAGCCTTTC TCTTCATCGA AGGATTCCTT AGCAACAC

48

【 0 0 9 8 】

配列番号：22

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGTGCTCGTG AAGTTGCTTC TGTATGAAC CGTGCTCTAG AA

42

【0099】

配列番号：23

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCTTTCTAG AGCACGGTTC ATAACAGAAG CAACTTCAC

39

【0100】

配列番号：24

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATTCTCTAG AGAACGCTCA TGATGAATCT GCTTACCTGG ATAAC

45

【0101】

配列番号 : 25

配列の長さ : 50

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列

CTTCTTCAGG TTATCCAGGT AAGCAGATTC ATCATGAGCG TTCTCTAGAG

50

【 0 1 0 2 】

配列番号 : 26

配列の長さ : 49

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列

CTGAAGAAGG AACTGGCTAA CGGTAACGAT GCTCTGCGTA ACGAAGATG

49

【 0 1 0 3 】

配列番号 : 27

配列の長さ : 49

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列

GAGAACGAGC ATCTTCGTTA CGCAGAGCAT CGTTACCGTT AGCCAGTTC

49



【0104】

配列番号：28

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGTTCTCC GTTCTACTCT GCTCTGCGTA ACACTCCGTC

40

【0105】

配列番号：29

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTTTGAAGGA CGGAGTGTTA CGCAGAGCAG AGTAGAACG

39

【0106】

配列番号：30

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTTCAAAGAA CGTAACGGTG GTAACCATGA TCCGTCTCGT ATGAAAG

47

【0107】

配列番号：31

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATAACAGCT TTCATACGAG ACGGATCATG GTTACCACCG TTACGTT

47

【0108】

配列番号：32

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGTTATCTA CTCTAAACAT TTCTGGTCTG GTCAGGATAG ATCTA

45

【0109】

配列番号：33

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCTTAGATC TATCCTGACC AGACCAGAAA TGTTTAGAGT A

41

【0110】

配列番号：34

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATTCAGATC TTCTTCTGCT GATAAACGTA AATACGGTGA TC

42

【0111】

配列番号：35

配列の長さ：44

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CATCCGGATC ACCGTATTTA CGTTTATCAG CAGAAGAAGA TCTG

44

【0112】

配列番号：36

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGGATGCATT CCGTCCGGCT CCGGGTACTG GTCTGGTAGA CATGTCTC

48

【0113】

配列番号：37

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCACGAGA CATGTCTACC AGACCAGTAC CCGGAGCCGG ACGGAATG

48

【0114】

配列番号：38

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGATCGTAA CATCCCGCGT TCTCCGACTT CTCCG

35

【0115】

配列番号：39

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTTCACCCGG AGAAGTCGGA GAACGCGGGA TGTTAC

36

【 0 1 1 6 】

配列番号：40

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGTGAAGGCT TCGTTAACTT CGATTACGGT TGGTTCGGTG

40

【 0 1 1 7 】

配列番号：41

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCTGAGCAC CGAACCAACC GTAATCGAAG TTAACGAAGC

40

【 0 1 1 8 】

配列番号：42

配列の長さ：44

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCAGACTGA AGCTGATGCT GATAAGACTG TATGGACCCA TGGA

44

【0119】

配列番号：43

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCTTCCATG GGTCCATACA GTCTTATCAG CATCAGCTTC A

41

【0120】

配列番号：44

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATTCCCATG GTAACCATTA CCATGCTCCG AACGGTTCT

39

【0121】

配列番号：45

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACCCAGAGA ACCGTTTCGGA GCATGGTAAT GGTTACCATG GG

42

【 0 1 2 2 】

配列番号：46

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGGGTGCTA TGCATGTATA CGAATCTAAA TTCCGTA ACT G

41

【 0 1 2 3 】

配列番号：47

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTTCAGACCA GTTACGGAAT TTAGATTCGT ATACATGCAT AG

42

【 0 1 2 4 】

配列番号：48

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCTGAAGGT TACTCTGACT TCGATCGTGG TGCTTAC

37

【0125】

配列番号：49

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGATAACGT AAGCACCACG ATCGAAGTCA GAGTAAC

37

【0126】

配列番号：50

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTTATCACCT TCATTCCGAA ATCTTGGAAC ACTGCTCC

38

【0127】

配列番号：51



配列の長さ : 38

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列

CTTTGTCCGG AGCAGTGTTT CAAGATTTCG GAATGAAG

38

【0128】

配列番号 : 52

配列の長さ : 38

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列

GGACAAAGTT AAACAGGGTT GGCCGTAATG AAAGCTTA

38

【0129】

配列番号 : 53

配列の長さ : 34

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列

AGCTTAAGCT TTCATTACGG CCAACCCTGT TTAA

34

【0130】

配列番号 : 54

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列

TTTTCCTCAGT CACGACGTTG

20

【 0 1 3 1 】

配列番号 : 55

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列

CAGGAAACAG CTATGACCAT G

21

【 0 1 3 2 】

配列番号 : 56

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸      合成DNA

配列

TAAGGAGGTT TAAAATGTCT GACGATCGTG TTAAGT

36

【0133】

配列番号：57

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TACGCCAAGG TTGTTAACCC A

21

【図面の簡単な説明】

【図1】

MTG発現プラスミド pTRPMTG-01 の構築図である。

【図2】

MTG発現プラスミド pTRPMTG-02 の構築図である。

【図3】

MTGが発現したことを示す SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の展開図である。

1. MTG (4  $\mu$ g)

2. pUC19/JM109 の菌体破碎全画分 (ネガコン)

3. pUCTRPMGTG-02/JM109 の菌体破碎全画分

4. 第3レーンの遠心上清画分

5. 第3レーンの遠心沈殿画分

【図4】

プラスミド pUCN216D の構築図である。

【図5】

MTG発現プラスミド pUCTRPMGTG (+) D2 の構築図である。

【図6】

アスパラギン酸残基に相当する G A T が欠失したことを示す図である。

【図 7】

N 末端アミノ酸がセリンであることを示す図である。

【図 8】

天然状態のトランスグルタミナーゼ（天然型）と遺伝子組み換え M T G から得られたもの（遺伝子組み換え型）の逆相 H P L C を示す図である。

1 : 遺伝子組み換え型 ; 2 : 天然型

各々、即ち天然型、遺伝子組み換え型のトランスグルタミナーゼ、それぞれ 8  $\mu$  g を以下の条件による逆相 H P L C に供した。

カラム : Vydac 214TP5410

溶離液 : A : 0.1 % T F A (トリフルオロ酢酸)

B : 0.1 % T F A、80 % アセトニトリル

溶出プログラム : 1 m l / 分

時間 (分)	A (%)	B (%)
0	70	30
20	50	50
25	0	100
28	0	100

【図 9】

トランスグルタミナーゼの天然状態のもの（天然型）及び遺伝子組み換え M T G から得られたものの（遺伝子組み換え型）C D スペクトルを示す図である。

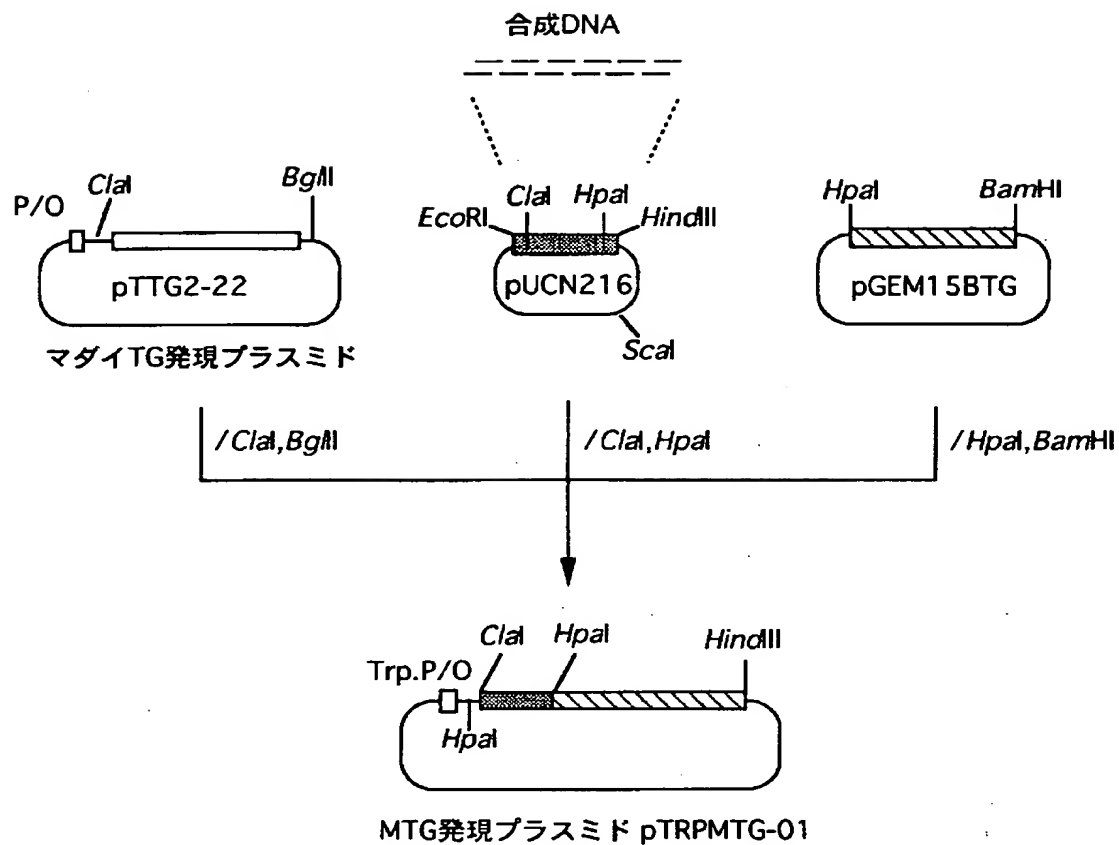
AVIV モデル 62 A D S (HART SCIENTIFIC 製) と 1 m m セルを用い、20℃で実施例 1 中の 4 検体の C D スペクトルを測定した。図中の検体番号 1 ~ 4 は下記の通りである。

検体番号	トランスグルタミナーゼ	緩衝液 p H 値	トランスグルタミナーゼ 濃度
1	天然型	4.0	3.22 mg/ml
2	天然型	5.8	3.20
3	遺伝子組み換え型	4.0	1.81
4	遺伝子組み換え型	5.8	1.69

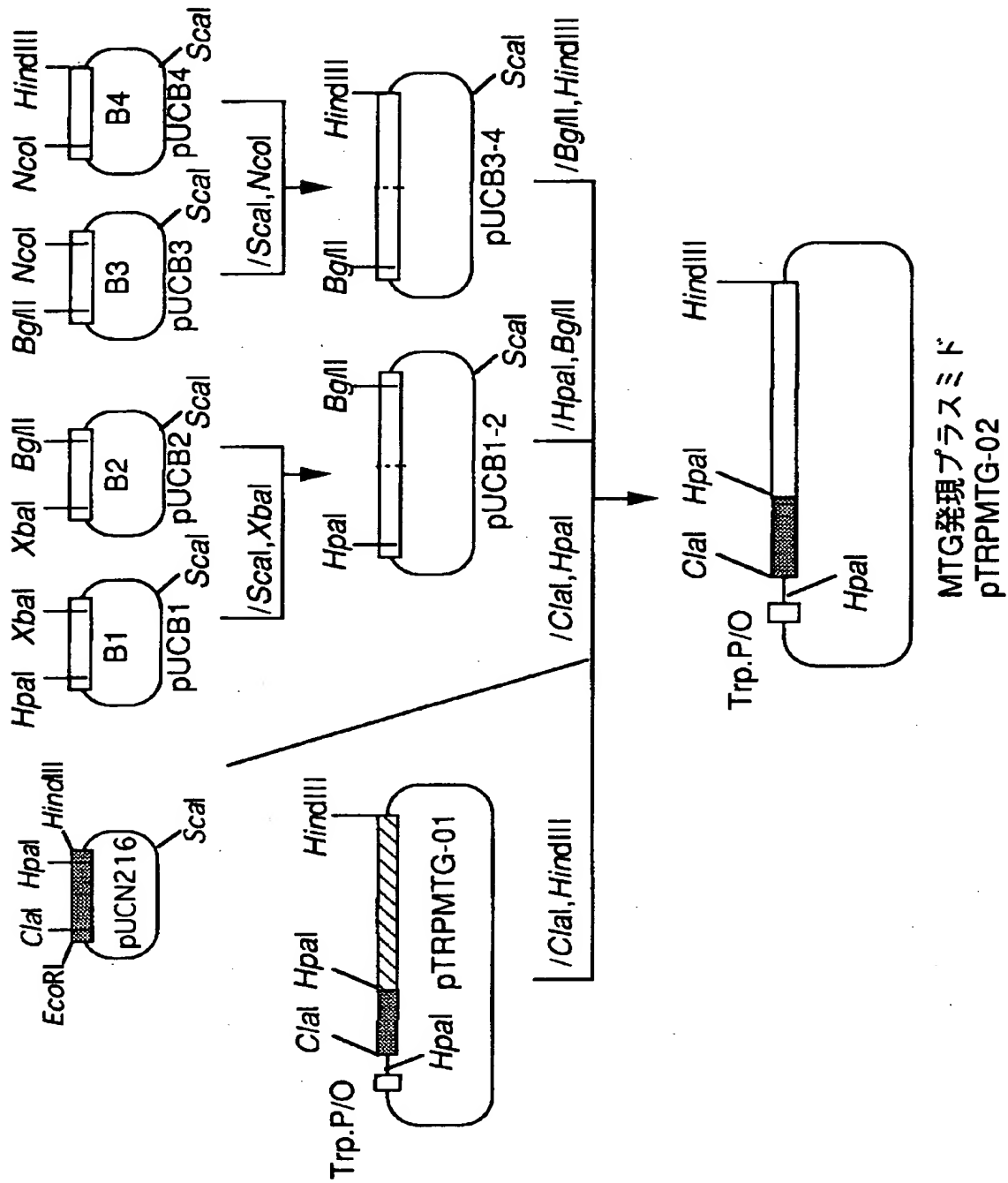
特平 10-373131

【書類名】 図面

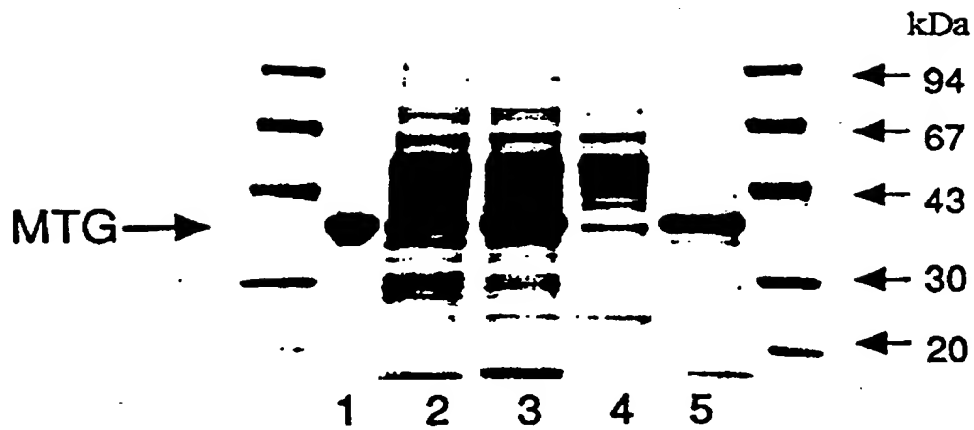
【図 1】



【図 2】



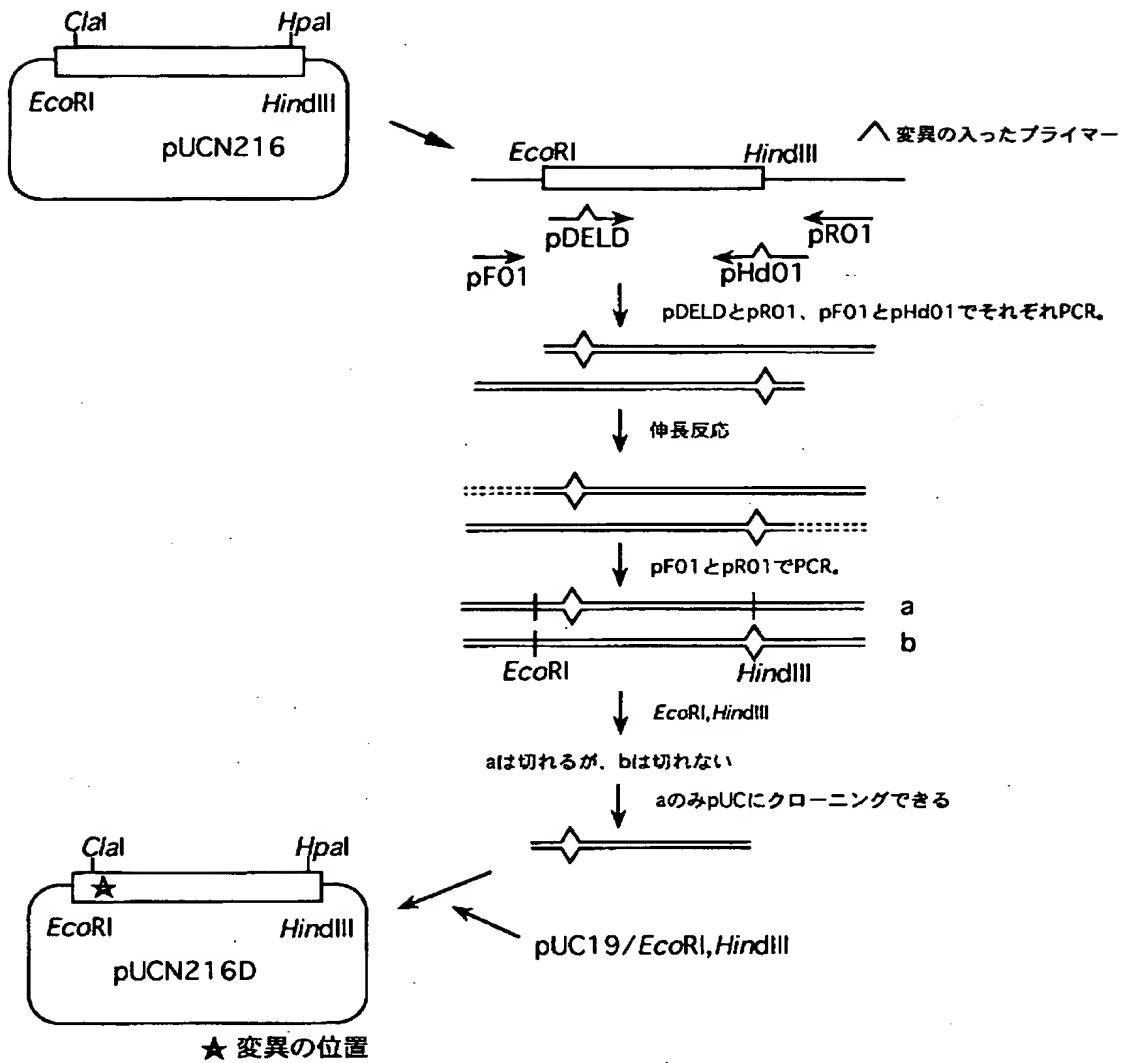
【図3】



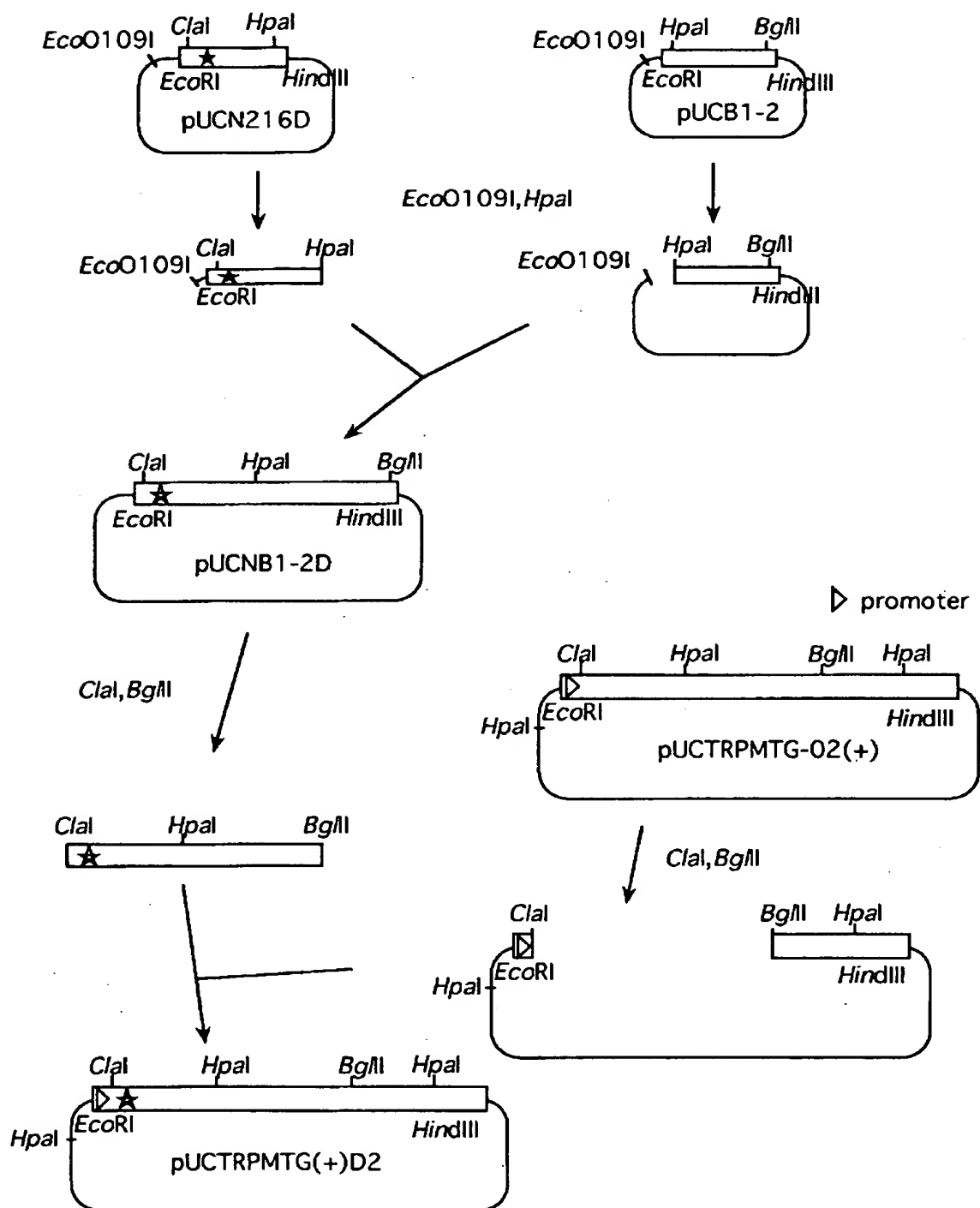
- 1.MTG(4 μg)
- 2.pUC19/JM109の菌体破碎全画分(ネガコン)
- 3.pUCTRPMTG-02/JM109の菌体破碎全画分
- 4.第3レーンの遠心上清画分
- 5.第3レーンの遠心沈殿画分



【図 4】



【図 5】



【図 6】

pUCTRPMTG(+)<sub>02</sub> : ...TTTAAATGGATTCTGACGAT...

M D S D D

pUCTRPMTG(+)<sub>D2</sub> : ...TTTAAATG---TCTGACGAT...

M S D D

天然型 MTG : D S D D

-は欠失塩基

【図 7】

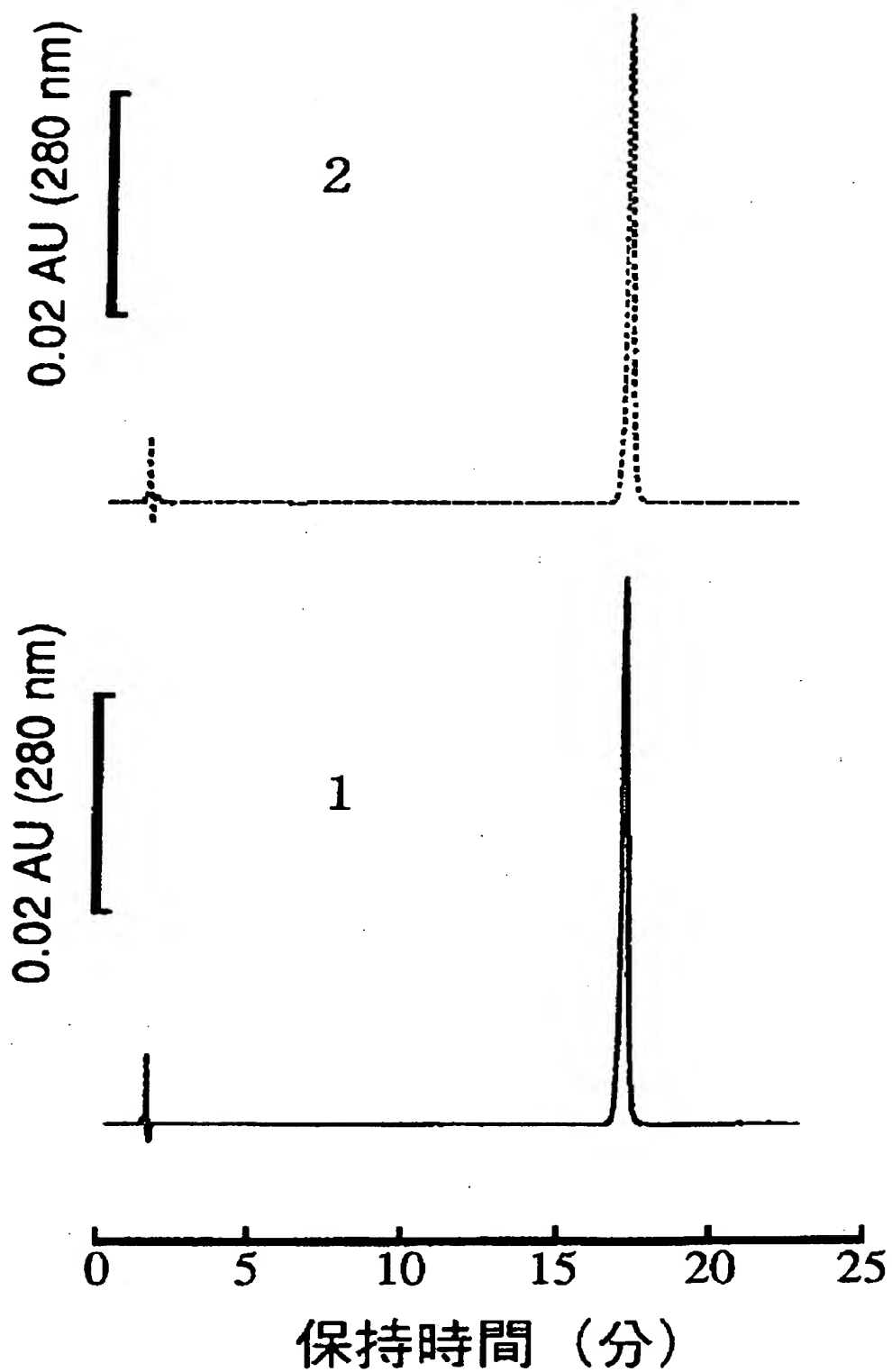
pUCTRPMTG(+)<sub>D2</sub> による MTG : SDDRV.....

参考

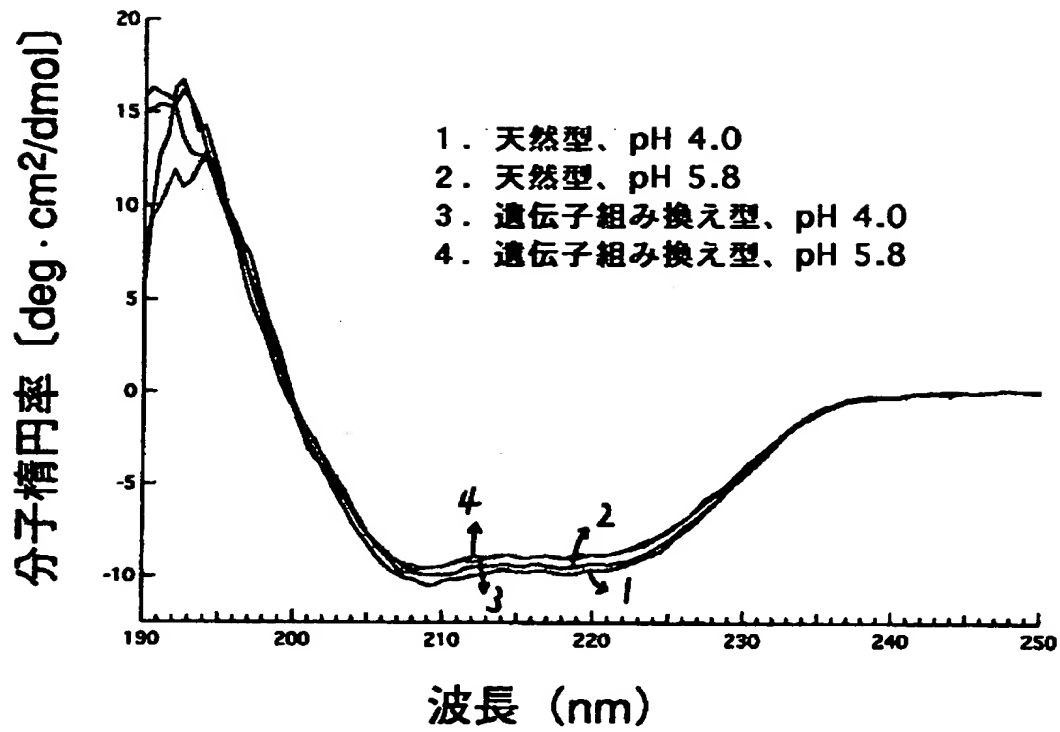
天然型 MTG : DSDDRV.....

pUCTRPMTG(+)<sub>02</sub> による MTG : MDSDDRV.....

【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

遺伝子組み換え微生物により生産されるような変性した状態で得られたトランスグルタミナーゼのリフォールディング方法を開発し、天然状態のトランスグルタミナーゼと実質的に同等の酵素活性、即ちトランスグルタミナーゼ活性を有するトランスグルタミナーゼを製造する方法を開発する。

【解決手段】

変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを少なくとも下記（a）及び（b）工程を含む工程に付することにより酵素活性を有するトランスグルタミナーゼを製造する：

（a）当該変性した状態にある酵素を水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめるようにする工程；及び

（b）前記構造形成の中間構造を形成した酵素を、水性媒体中 pH 値が中性領域下で酵素活性を有する状態の高次構造を形成せしめるようにする工程。

天然状態のトランスグルタミナーゼと実質的に同等の酵素活性を有し、かつ極めて高純度のトランスグルタミナーゼを工業的に製造することができる。

【選択図】

なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成10年 特許願 第373131号
受付番号	59800856177
書類名	特許願
担当官	清水 スズ子 1350
作成日	平成11年 6月16日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000000066
【住所又は居所】	東京都中央区京橋1丁目15番1号
【氏名又は名称】	味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】	100080229
【住所又は居所】	神奈川県横浜市港北区新横浜3丁目20番12号 望星ビル7階加藤内外特許事務所

【氏名又は名称】	石田 康昌
----------	-------

【代理人】

申請人

【識別番号】	100080816
【住所又は居所】	神奈川県横浜市港北区新横浜3丁目20番12号 望星ビル7階加藤内外特許事務所

【氏名又は名称】	加藤 朝道
----------	-------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号  
氏 名 味の素株式会社